

構造解析が導いたタンパク質の改造とその理解

小杉貴洋

自然科学研究機構 分子科学研究所

Structural Analysis for Engineering Protein and Interpreting its Mechanism

Takahiro KOSUGI

Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences

Abstract

我々は、計算機を用いて回転型分子モータータンパク質を改造しアロステリック部位を設計することで、その回転能を加速・制御することに成功した (Fig. 1) [1]。この研究において、これまでにすでに得られている多くのタンパク質の構造情報や、我々自身が Photon Factory において行った改造タンパク質の構造解析が重要な役割を果たしたので、構造解析によりもたらされた成果を中心に報告させていただきたい。また、近年登場した深層学習を用いたタンパク質構造予測法は、タンパク質構造解析にも大きな影響をもたらした [2]。我々の研究を通して感じたタンパク質構造解析の変わらない重要性についてもお伝えしたい。

1. はじめに

近年、計算機を用いたタンパク質の設計技術が急速に発展してきており、天然には全く存在しないようなタンパク質が主鎖構造から設計できるようになってきた [3]。同時に、それらの技術を用いて、天然のタンパク質を望んだ機能を果たすように改造することも可能になってきている。我々も、回転型分子モータータンパク質の改造をはじめ、様々なタンパク質の設計・改造を行っている [1]。そのような研究の中で、タンパク質の構造解析が非常に大きな役割を果たしている。

2. 天然タンパク質の改造には構造情報が必要だった

我々が天然タンパク質を改造する際、ターゲットとなる天然タンパク質の三次元構造をもとにして改造を行う。つまり、ターゲットとなるタンパク質の構造情報が必要であ

る。幸いにも、回転型分子モータータンパク質 V_1 -ATPase を改造した際には、すでに天然 V_1 -ATPase の結晶構造が明らかになっていた [4] (Fig. 2(a))。もし、構造情報が存在しなければ、ターゲットのタンパク質構造を解くところから研究を始めなければならなかったため、より一層困難であったであろう (そもそも、構造情報が存在しなかった場合には、それを改造しようとは考えなかっただろう)。

我々は V_1 -ATPase の改造において Pseudoenzyme (擬似酵素) に着目した。擬似酵素は、進化の過程で酵素活性に重要なアミノ酸を失っており、酵素活性を持たない酵素のホモログである。この擬似酵素に関して、タンパク質複合体に含まれる擬似酵素の多くが、複合体の機能をアロステリックに制御していることが報告されている。 V_1 -ATPase は、二つのタンパク質 (A subunit, B subunit) が3つずつ交互に並んだ6量体の中で軸となるタンパク質が回転す

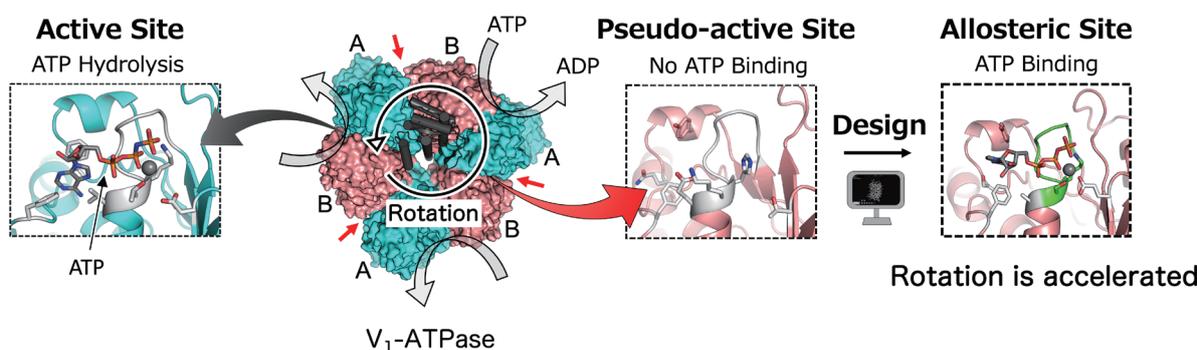


Figure 1 Allosteric sites in a rotary molecular motor, V_1 -ATPase, were created by restoring lost functions (ATP binding ability) of the pseudo-active sites which are predicted to have been lost during the evolution.

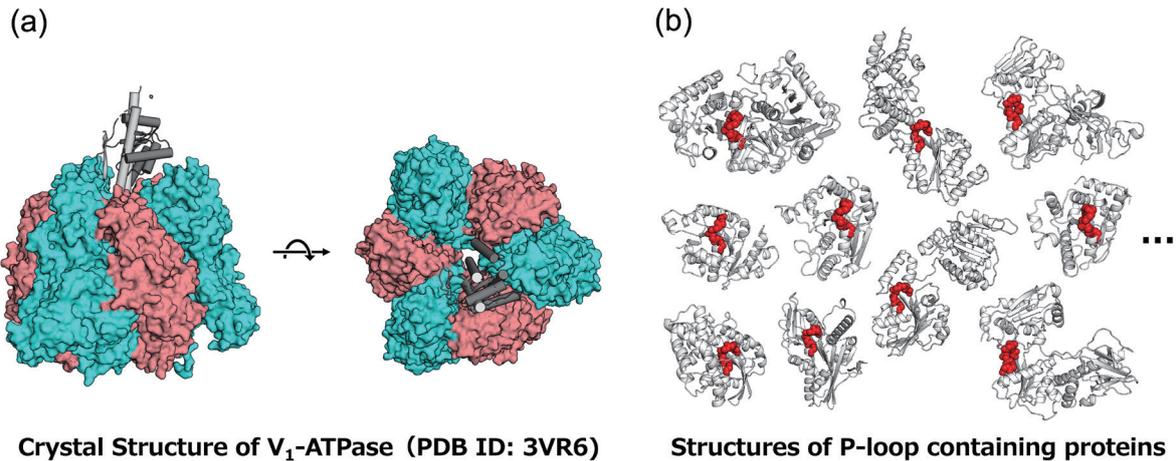


Figure 2 (a) Three dimensional structure of our target protein is necessary for redesigning it. We designed allosteric sites based on the crystal structure of *Enterococcus hirae* V_1 -ATPase. (b) To characterize the P-loop motif, many known P-loop containing structures were needed. We analyzed P-loop containing protein structures which were collected from protein structure database. P-loop motifs are shown as red spheres.

る。そして、A subunit 側では ATP を加水分解するが、B subunit 側では ATP を結合すらしないことが知られている。我々はこの B subunit が A subunit の擬似酵素であることに気づいた。そして、B subunit を改造することでアロステリックに回転を制御できるのではないかと考え、B subunit において加水分解活性を持っていたと予想される部位 Pseudo-active Site (擬似活性部位) に ATP 結合能を復活させることにした (Fig. 1)。

ATP 結合能の設計は、多くの ATP 加水分解酵素に共通して含まれるモチーフ構造である P-loop モチーフを、擬似活性部位に創ることにより行った。P-loop モチーフを設計するために、まずは P-loop を持つタンパク質を構造情報データベースから集め、それらを解析し、P-loop モチーフがどのような特徴を持っているのかを調べた。ここで、P-loop モチーフを持つ構造が多数解かれていたことが重要であった (Fig. 2(b))。つまり、これまでの構造解析研究の成果を利用できたため、今回の研究が進んだことになる。この解析により、我々は P-loop モチーフが持ついくつかの特徴を見つけ出し、それらの特徴を持ったループ構造を擬似活性部位に構築した。そして、さまざまな構造の ATP 分子を用いて結合状態を探索しながら、周りのアミノ酸配列を最適化することで、ATP 結合部位の設計を行った。それらの候補となる設計タンパク質の中で、最も ATP 結合能を持つ可能性が高いと予想された改造 V_1 -ATPase に対して、実験により ATP 結合能や回転能を測定することで、アロステリック部位が設計できているかどうかを検証することにした。

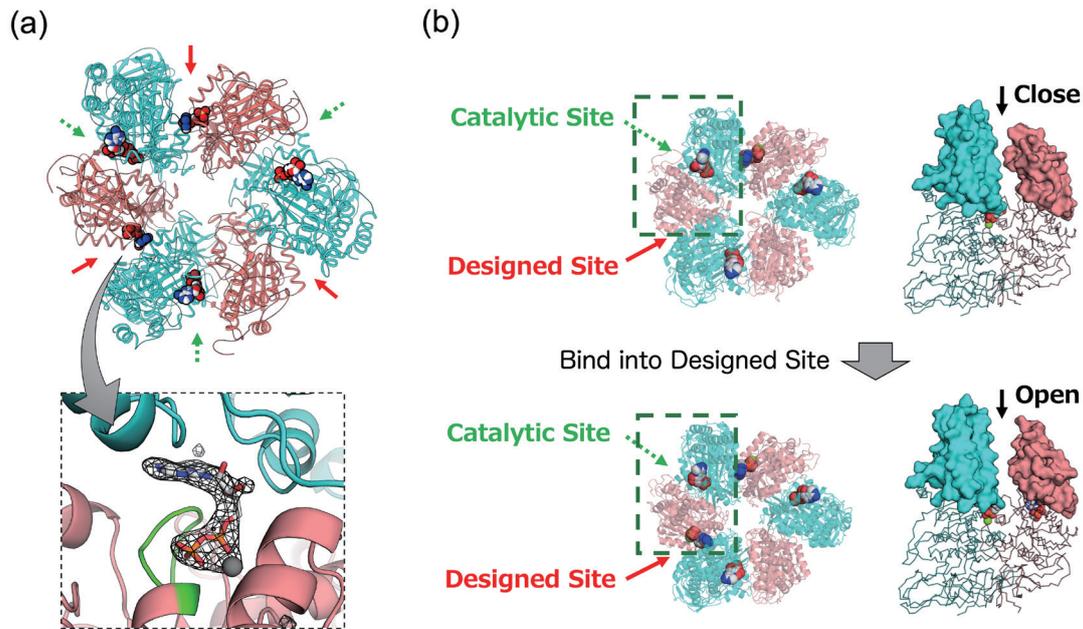
3. 結晶構造解析が改造タンパク質の理解に大きな役割を果たした

最初に、大腸菌を用いて改造した B subunit を A subunit と発現・精製し、それらが 6 量体構造を形成していることを確認した。次に、設計部位への ATP 結合能を測定しようとしたが、ATP 加水分解活性を持つ A subunit が存在す

るため、その確認は非常に困難であった。というのも、A subunit に ATP が結合しないように、その活性部位のアミノ酸に変異を導入すると、複合体を形成しなくなってしまうのである。そこで、結晶構造解析により、設計部位に ATP (あるいはそれに類似する核酸) が結合していることを確かめることにした。天然の V_1 -ATPase の結晶構造が得られていることもあり、結晶化はそれほど難しくはなかったが、設計部位に核酸が結合している構造を得るには大変苦労した。何度も条件を変えながら結晶を準備し Photon Factory での測定を繰り返すことにより、ついに設計部位に ADP が結合している構造を得ることができた (Fig. 3(a))。これにより、核酸結合能を設計できていることが確認された。この結晶構造が得られていなければ、その確認がなされなかったため、この研究において非常に重要な結果であった。

さらに、一分子実験により回転能を調べると、天然の V_1 -ATPase より回転が速くなっていることが明らかとなった。そして、一分子実験の詳細な解析により、回転の加速は ATP 加水分解過程において ADP が乖離する際に起こっていることが明らかとなった。我々は、ADP 乖離が加速されるメカニズムを明らかにするために、ADP の結合数が異なるいくつかの結晶構造を解いた。その結果、設計部位に ATP が結合すると、活性部位に構造変化が起こり、ADP の乖離が速くなっていることが明らかとなった (Fig. 3(b))。つまり、当初より目指していたアロステリーによる加速が実現できていると確認された。このメカニズムの解明にも、結晶構造解析が必須であった。

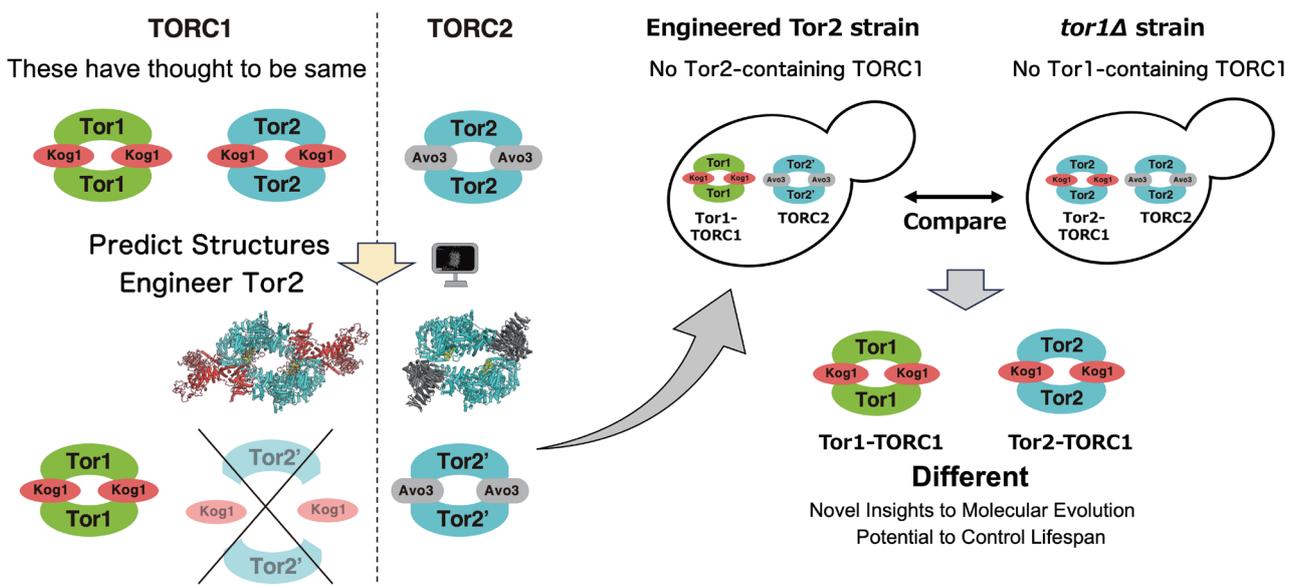
回転型モーターの改造では、(1)天然 V_1 -ATPase の構造の存在、(2)P-loop を含んだ多くの既知構造の存在といったこれまでに解析された構造情報が必要であった。また、(3)ATP 結合能が設計できているのか確認、(4)加速メカニズムの解明において、新たに行った構造解析が重要な役割を果たした。研究を進めていくにあたり、多くの場面で結晶構造解析の重要性を強く感じた。



4. 構造予測技術が発展してもタンパク質の設計・改造において構造解析の重要性は変わらないだろう

もちろん既知構造が存在しなくても、計算機により予測された構造を用いて、構造の改変が可能な場合もあると考えている。実際に、我々は細胞の環境への応答と寿命に重要な役割を果たすトア (TOR: Target of Rapamycin) 複合体について、予測構造に基づいて特定の複合体状態を取らないように改造し、これまで同じだと考えられていた二つの

複合体状態が異なる役割を果たすことを示すことに成功した [5] (Fig. 4)。これにより、我々のタンパク質複合体改造技術が、細胞生物学にも貢献できることを示すことができたと考えている。近年、深層学習を用いたタンパク質の構造予測手法の出現により、高い精度で構造が予測できるようになったと言われている。我々の研究では、まだ深層学習を用いた構造予測技術は用いていないが、構造予測技術が発展したことにより、より精度の高い予測構造が得ら



れるため、より複雑な問題へのアプローチも可能になっていくことが期待できる。

ただし、構造予測技術が発展したからといって、実験による構造解析の重要性が変わるわけではないと考えている。そもそも、構造予測技術の発展は、実験構造データが蓄積されてきたことにより成し遂げられた。これまでに構造解析により得られた多くの構造データがあったからこそ、深層学習の発展に合わせて、構造予測技術は発展することができた。今後、新たなデータの供給無くして構造予測技術のさらなる発展も難しいだろう。例えば、これまで自然界には存在しなかった人工設計タンパク質のような既知の構造とは構造が大きく異なることが予想される構造は、正しく予測できないことが多いと言われている。そのため、新たなタンパク質を創り出した際にも、これまでに明らかになっているものとは全く異なる構造を持つ天然タンパク質に対しても、実験的に構造を明らかにする必要がある。そのようなタンパク質の構造データを得て、それらを含めたデータベースを用いて改めて学習することで、構造予測技術もさらに発展していくだろう。

回転型分子モーターの改造では、実験構造をもとにして改造を行った。ターゲットの構造を予測構造に置き換えることは可能であるが、実際には予測構造と実験構造では細かい点で異なる場合も多い。もし改造したい部分に大きな違いがある際には、もちろん精度の高い実験構造に基づいて改造した方が良い結果が得られると予想される。また、我々は回転加速メカニズムを明らかにするために、結晶構造解析により低分子結合に伴う構造変化を見出した。低分子化合物の結合による構造変化のように、わずかな条件の違いで構造状態が変わるものの構造を明らかにすることは、タンパク質の機能発現メカニズムを解明するために重要である。しかしながら、そのような構造変化の予測は、現在の構造予測技術では難しいと考えられている。そのため、今後もメカニズムの解明には、分子シミュレーションなどのその他の技術とともに実験による構造解析は必須であるだろう。

まとめ

これからも、実験によるタンパク質の構造解析、タンパク質の設計・改造技術、そしてタンパク質の構造予測技術はそれぞれの利点を活かしながら、共に発展していくのではないかと考えている。そういった中で、我々のタンパク質設計・改造技術は、構造解析技術の恩恵を受け続けるであろう。今回紹介したのは、結晶構造解析についての例だけであったが、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の発展により、大きな構造が次々と報告されている。予測構造はあくまで予測であり、実験構造は事実である。構造予測技術を取り入れていくのはもちろん、発展を続ける実験による構造解析技術も積極的に取り入れていきたい。

謝辞

本研究は、多くの共同研究者の皆さまのおかげで成し遂げることができました。分子科学研究所/生命創生探究センター古賀 G において恵まれた研究環境の中で自由に研究を行わせてくださった古賀信康教授(現所属:大阪大学)、V₁-ATPase の研究を共に行った分子科学研究所の飯野亮太教授、飯田龍也大学院生(現所属:理化学研究所)、物質構造科学研究所の田辺幹雄特任准教授、トア複合体の研究を共に行った基礎生物学研究所の鎌田芳彰助教、大坪瑠子研究員(現所属:東京大学)、山下朗兼任准教授(現所属:東京大学)、長浜バイオ大学の梅田知晴大学院生、向由起夫教授、名古屋大学の太塚北斗助教らに、深く感謝申し上げます。

また本研究は、新学術領域「発動分子科学」、さきがけ「高次構造体」などの支援を受けて行われました。この場を借りて深くお礼申し上げます。

本研究における構造解析は、主に AMED の課題番号 JP20am0101071 (サポート番号 BINDS0471) の支援を受けて行われました。また、Photon Factory の放射光共同利用実験(課題番号 2017G141)としても行われました。田辺幹雄特任准教授や Photon Factory のスタッフの方々には大変お世話になりました。ありがとうございました。

引用文献

- [1] T. Kosugi, T. Iida, M. Tanabe, R. Iino, and N. Koga, *Nat. Chem.* **15**, 1591 (2023).
- [2] J. Jumper *et al.*, *Nature* **596**, 583 (2021).
- [3] P.-S. Huang, S. E. Boyken, and D. Baker, *Nature* **537**, 320 (2016).
- [4] S. Arai, S. Saijo, K. Suzuki, K. Mizutani, Y. Kakinuma, Y. Ishizuka-Katsura, N. Ohsawa, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, S. Iwata, I. Yamato, and T. Murata, *Nature* **493**, 703 (2013).
- [5] Y. Kamada, C. Umeda, Y. Mukai, H. Ohtsuka, Y. Otsubo, A. Yamashita, and T. Kosugi, *J. Cell Sci.* **137**, jcs261625 (2024).

(原稿受付日: 2024 年 3 月 22 日)

著者紹介

小杉貴洋 Takahiro KOSUGI



自然科学研究機構分子科学研究所 助教
〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38 番地

e-mail: takahirokosugi@ims.ac.jp

略歴: 2012 年京都大学大学院理学研究科博士課程修了, 2012 年ワシントン大学博士研究員, 2015 年自然科学研究機構分子科学研究所助教。博士(理学)。

最近の研究: 計算機によるタンパク質機能設計とその応用